

アロキサン, ストレプトゾトシンによる膵 ランゲルハンス島 DNA 鎖切断と 実験的糖尿病発症の防止機構

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)
富山医科薬科大学医学部生化学第一講座 (主任: 岡本 宏教授)

山 本 博

(昭和56年11月18日受付)

本論文の要旨の一部は, 1980年第53回日本生化学会・第23回日本糖尿病学会, 1981年第54回日本生化学会・第24回日本糖尿病学会・第40回日本癌学会において発表した。

Key words アロキサン, ストレプトゾトシン, 膵ランゲルハンス島, DNA 鎖切断, プロインスリン合成

アロキサン(alloxan)とストレプトゾトシン(streptozotocin)は, きわめて強力な催糖尿病作用を示し, 実験的糖尿病の作製に広く用いられてきている。これらの催糖尿病物質の作用機構を知ることは, 糖尿病の成因, 治療さらにはその予防を解明するうえで重要と考えられる。

従来, 膵ランゲルハンス島のプロインスリン合成を低下させることがアロキサンおよびストレプトゾトシンの催糖尿病作用の主要因と考えられてきたが, このプロインスリン合成低下のメカニズムについては不明であった。

筆者らは, ラット膵からの分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* の実験系を確立し^{1)~9)}, アロキサンとストレプトゾトシンがランゲルハンス島細胞の DNA 鎖を切断して核ポリ ADP-リボース合成酵素を活性化し, その結果細胞内 NAD 量を減少させプロインスリン合成を低下させることを明らかにしてきた^{10)~18)}。

本研究では, さらに, この DNA 切断にはじまる一連の“Biochemical events”が, アロキサンやストレプトゾトシンの *in vivo* 投与によっても引き起こされるか

どうかを検討するとともに, 分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* の系で, DNA 切断のメカニズムさらにはプロインスリン合成低下の防止機構につき検討した。

材料および方法

1. 実験動物へのアロキサンとストレプトゾトシンの投与

体重 200-250g の Wistar 系雄ラットに, 40mg/kg のアロキサン (和光純薬工業) あるいは 50mg/kg のストレプトゾトシン (Upjohn) を静脈内投与した。この投与量ではほぼ 100% の確率でラットに糖尿病が誘発される¹⁹⁾。

2. 膵ランゲルハンス島, 膵外分泌腺細胞, 肝細胞の分離

アロキサンあるいはストレプトゾトシンを投与したラットから, 一定時間後に膵臓および肝臓を摘出し, 膵からは Okamoto ら²⁰⁾の方法によりランゲルハンス島と外分泌腺細胞とを分離し, 肝からは Cox ら²¹⁾の方法により遊離肝細胞を調製した。

3. アルカリ性シヨ糖密度勾配遠心法による DNA

DNA Strand Breaks by Alloxan and Streptozotocin in Pancreatic Islets of *Langerhans* and Protecting Mechanisms against Experimental Diabetes. Hiroshi Yamamoto, Department of Biochemistry (Director: Prof. Y. Yoneyama), School of Medicine, Kanazawa University. Department of Biochemistry (Director: Prof. H. Okamoto), School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University.

の分析

100 - 150 個のランゲルハンス島, $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 個の膵外分泌腺細胞あるいは肝細胞を, 5 - 20% アルカリ性シヨ糖密度勾配上に重層した溶液 (1 N NaOH, 0.01 M EDTA, 1% (v/v) Triton X - 100) 中で溶解し, 26,000 rpm \cdot 20°C \cdot 200 分間の遠心後, シヨ糖勾配を分画し^{(11)~(13)}, 各画分中の DNA 量を蛍光法⁽²²⁾により測定した。

4. NAD 量の測定

分離ランゲルハンス島, あるいは予めハンクス液で灌流した肝組織を 0.5N 冷過塩素酸中で破碎し, 酸可溶性画分中の NAD 量を筆者らの既述の方法^{(10)~(12)}により測定した。

5. 分離ランゲルハンス島のインキュベーション

Krebs - Ringer 重炭酸緩衝液 (pH7.4) に 5mM グルタミン酸 Na, 5mM フマル酸 Na, 5mM ピルビン酸

Na, 2mg/ml 牛血清アルブミン, 2.8mM グルコースを加えた培地中で^{(10), (11), (23)}, 無処置ラットからの分離ランゲルハンス島を, 0.75 - 1.0mM アロキサンあるいは 2 - 3mM ストレプトゾトシン存在下, またはアロキサン, ストレプトゾトシンとスーパーオキシジスムターゼ (superoxide dismutase) (Sigma, from bovine blood), カタラーゼ (catalase) (Sigma, from bovine liver, thymol - free), ポリ ADP - リボース合成酵素阻害物質との共存下, 37°C 20 分間インキュベートし, インキュベーション後, ランゲルハンス島 DNA をアルカリ性シヨ糖密度勾配遠心法により分析した。

6. プロインスリン合成能の測定

分離ランゲルハンス島をアロキサンあるいはストレプトゾトシン存在下またはアロキサン, ストレプトゾトシンと種々の物質との共存下に Krebs - Ringer 培地中で 37°C 5 分間インキュベートした後, ^3H -ロイシン

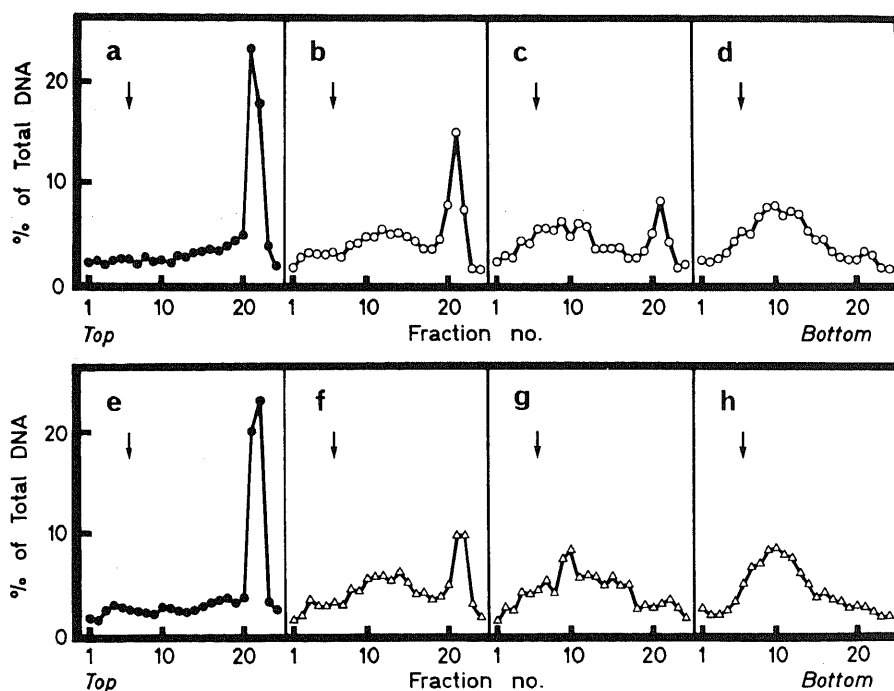


Fig 1. Sedimentation profile in an alkaline sucrose density gradient of DNA of islets from alloxan- or streptozotocin - treated rats. Each point represents the percentage of total DNA recovered; recovery was between 85% and 100%. ●; DNA of islets from pancreas of untreated rats (a and e). ○; DNA of islets from pancreas removed at 5 min (b), 10 min (c) or 20 min (d) after intravenous administration of 40mg/kg alloxan. △; DNA of islets from pancreas removed at 5 min (f), 10 min (g) or 20 min (h) after intravenous administration of 50mg/kg streptozotocin. Sedimentation was from left to right. Arrow indicates the position of a bacteriophage λ DNA (3.2×10^7 daltons, New England BioLabs).

(New England Nuclear) と 20mM グルコースを加えてさらに 60 分間インキュベートし、生成された³H-ブロインスリン量を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後測定した^{10),11),24)}.

7. 核ポリ ADP-リボース合成酵素活性の測定

ランゲルハンス島から細胞核を分離し^{10),11)},その一定量 (DNA として約 1.5 μ g) を 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2mM β -NAD⁺, 1mM ジチオスレイトール, 5.8×10^{-2} μ Ci [U-¹⁴C-adenine] NAD (Radiochemical Center), 0.2 μ g/ μ l 牛胸腺ヒストン H1 を含む溶液中で 25°C 10分間インキュベートし,¹⁴C-ポリ ADP-リボースの生成量を測定した^{10),11),13)}.

成 績

I. アロキサン, ストレプトゾトシンの *in vivo* 投与実験

1. アロキサン, ストレプトゾトシンの *in vivo* 投与による膵ランゲルハンス島 DNA 鎖の切断

アロキサン (40mg/kg) あるいはストレプトゾトシン (50mg/kg) をラットに投与した後, 5-20 分後に膵を摘出してランゲルハンス島を分離した. 図 1 に, ランゲルハンス島 DNA のアルカリ性ショ糖密度勾配中での沈降像を示す. 無処置ラットからのランゲルハンス島 DNA は, bottom に近い intact な DNA の沈降位置に単一のピークとして回収された (図 1, a, e). アロキサンあるいはストレプトゾトシン投与ラットのランゲルハンス島 DNA は, 投与後 5-10 分後にすでに, 低分子側に幅広いピークとして沈降し, これに伴って intact な DNA は減少した (図 1, b, c, f, g). 投与後 20 分では, アロキサン, ストレプトゾトシンのいずれによっても, ランゲルハンス島 DNA はほぼ完全に断片化されていた (図 1, d, h).

2. アロキサン, ストレプトゾトシン *in vivo* 投与の膵外分泌腺細胞, 肝細胞 DNA におよぼす影響

つぎにアロキサンあるいはストレプトゾトシンの投与により, ランゲルハンス島以外の組織の DNA がどのような影響を受けるかを検討した. アロキサン (40mg/kg) あるいはストレプトゾトシン (50mg/kg) 投与後 20 分後にはランゲルハンス島 DNA はほぼ完全に断片化されていた (図 2, a, b) が, 同時に分離した膵外分泌腺細胞の DNA には断片化はほとんど認められず, 対照の無処置ラットの外分泌腺細胞 DNA と同一の沈降像を示した (図 2, c, d). 肝細胞 DNA は, ストレプトゾトシンにより断片化されたが, アロキサンによ

っては全く影響を受けなかった (図 2, e, f).

3. アロキサン, ストレプトゾトシン *in vivo* 投与の膵ランゲルハンス島, 肝細胞 NAD 量におよぼす影響

筆者らは先に, 分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* の実験により, DNA 鎖が切断されると核ポリ ADP-リボース合成酵素が活性化され, その結果細胞内 NAD 量が著しく減少することを明らかにしている¹¹⁾ (図 3). そこで今回, ラットにアロキサンあるいはストレプトゾトシンを DNA 切断が認められたと同一の条件で投与後, ランゲルハンス島と肝細胞とを分離し, 細胞内の NAD 量を測定した. その結果, 表 1 に示すように, アロキサンあるいはストレプトゾトシンの *in vivo* 投与によっても, ランゲルハンス島 NAD 量は著しく減少することが見出された. また, 肝 NAD 量はストレプトゾトシンにより対照の 74% に減少したが, アロキサ

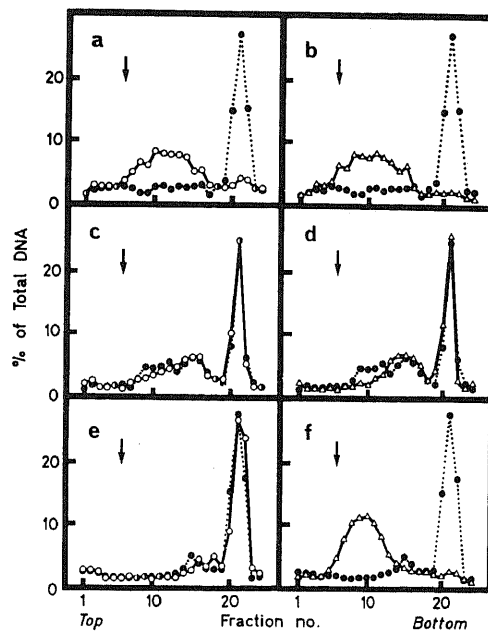


Fig 2. Sedimentation profile in an alkaline sucrose gradient of DNA of rat tissues after alloxan- or streptozotocin-treatment. Each point represents the percentage of total DNA recovered. a and b; islet DNA. c and d; DNA of pancreatic exocrine cells. e and f; hepatocyte DNA. ●.....●; untreated rats. ○—○; rats treated with alloxan (40mg/kg). △—△; rats treated with streptozotocin (50 mg/kg). Sedimentation was from left to right. Arrow indicates the position of a bacteriophage λ DNA.

ンによっては影響されなかった。

以上の結果から、先に筆者らが分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* 実験で見出した、DNA 切断にはじまる一連の“Biochemical events”^(13,25)が、アロキサンとストレプトゾトシンの *in vitro* 投与によってもランゲルハンス島細胞にほぼ選択的にひき起こされることが明らかとなった。

II. 分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* 実験

つぎに、無処置ラットからの分離ランゲルハンス島を用い、アロキサンとストレプトゾトシンによるプロインスリン合成低下の防止機構について、DNA 切断の防止・ポリ ADP-リボース合成酵素の制御の2つの観点から検討した。

1. アロキサン、ストレプトゾトシンのランゲルハンス島 DNA 切断作用におよぼすスーパーオキシドジムスターゼ、カタラーゼの影響

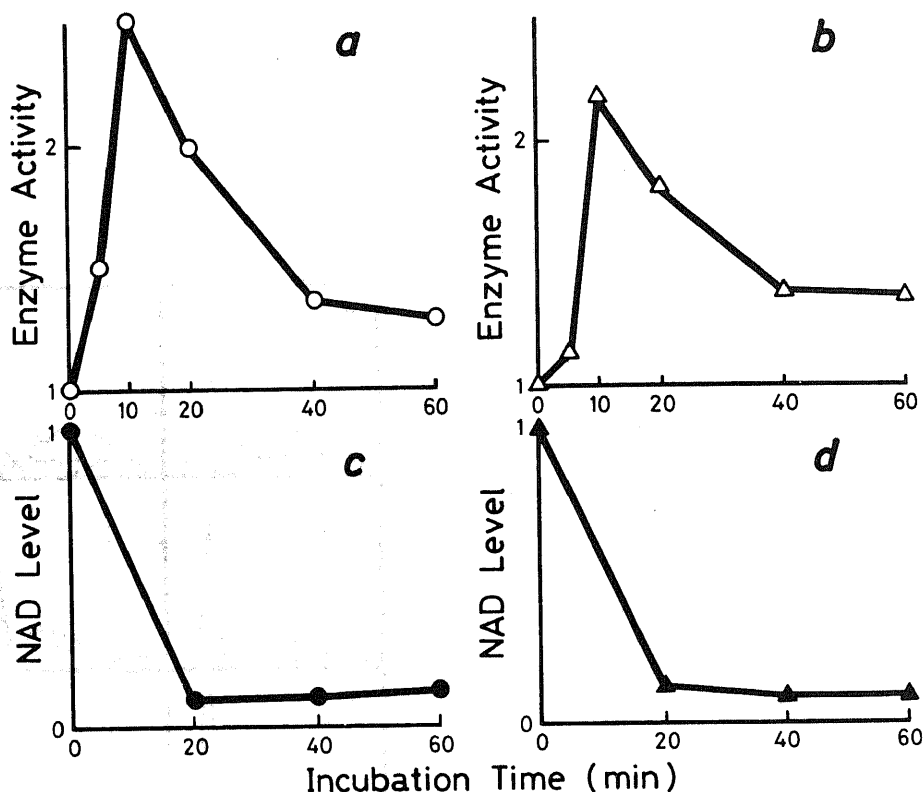


Fig 3. Effect of alloxan or streptozotocin on poly(ADP-ribose) synthetase activity and NAD content in pancreatic islets⁽¹⁾. Batches of 300 islets were incubated for 0-60 min at 37°C in the presence of alloxan or streptozotocin. After incubation, nuclear fractions were prepared from islets and assayed for poly(ADP-ribose) synthetase activity. The DNA content of each islet nuclear fraction was determined by a fluorometric method⁽²²⁾ and used to estimate accurately the enzyme activity. All activities were related to activity at 0 min (10.9 pmoles poly(ADP-ribose) synthesized per 10 min per μ g islet nuclear DNA). a, Poly(ADP-ribose) synthetase activity in islets incubated with 1 mM alloxan (○); b,

poly(ADP-ribose) synthetase activity in islets incubated with 2 mM streptozotocin (△). For determination of islet NAD content, batches of 100 islets were incubated for 0-60 min after which they were disrupted by sonication in 1 ml of cold 0.5 N perchloric acid. The acid-soluble extract of islets was brought to pH 5.0 with KOH, and NAD content in the extract was determined. The values were corrected for overall recovery by the addition of ¹⁴C-NAD, and related to NAD content at 0 min (2.62 pmoles NAD per islet). c, NAD content in islets incubated with 1 mM alloxan (●); d, NAD content in islets incubated with 2 mM streptozotocin (▲).

Table 1. Effect of alloxan- or streptozotocin-administration on islet or liver NAD content

Tissue	Administration	NAD Content
		pmole/ μ g DNA
Islet	None (Control)	50.0 (100)
	40 mg/kg Alloxan	5.9 (12)
	50 mg/kg Streptozotocin	4.8 (10)
Liver	None (Control)	110.9 (100)
	40 mg/kg Alloxan	113.6 (102)
	50 mg/kg Streptozotocin	82.1 (74)

After administration of alloxan or streptozotocin, pancreatic islets and liver were simultaneously removed from each rat, and NAD content of the tissues was determined. 14 C-NAD was added to each sample before the extraction in perchloric acid, and the recovery of 14 C-radioactivity in the final preparation was referred to for correction of the NAD value for overall recovery. Recovery was between 85% and 100%. The numbers in parentheses give the percentage of the control.

図4, aに示すように, 分離ランゲルハンス島を1mMのアロキサン存在下に20分間インキュベートすると, DNAは著しく断片化され低分子側に幅広いピークを示す。ところが, 培地中にラジカスカルベンジャーであるスーパーオキシドジスムターゼ(2×10^3 U/ml)を共存させると, 低分子側に沈降するDNAは減少し, かなりの量のDNAがintact DNAの沈降位置に回収されることが見出された(図4, b)。このことは, スーパーオキシドジスムターゼがアロキサンのDNA切断作用を防止することを示している。また, カタラーゼの添加によってもアロキサンによるDNA切断は著明に防止された。さらに, スーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼの両者を共存させると, アロキサンのDNA切断作用はほぼ完全に防止されることが見出された。これらの結果は, アロキサンが活性酸素の生成を介してランゲルハンス島のDNA鎖を切断することを示唆している。

一方, ストレプトゾトシンのDNA切断作用(図4, c)は, スーパーオキシドジスムターゼにより防止されなかった(図4, d)。

2. スーパーオキシドジスムターゼ, カタラーゼによるアロキサンのプロインスリン合成低下作用の防止

筆者らがすでに明らかにしているように, ランゲルハンス島DNA鎖が切断されると, その結果プロインスリン合成は著しく低下する¹¹⁾。そこでつぎに, アロキサ

ンのプロインスリン合成低下作用が, DNA切断を防止したラジカスカルベンジャーにより防止されるかどうかを調べた。その結果, 図5に示すように, アロキサンによるランゲルハンス島プロインスリン合成の低下は, スーパーオキシドジスムターゼの濃度に依存して防止され, さらに, スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼの両者が共存すると, より顕著な防止効果が認められた。

他方, ストレプトゾトシンのプロインスリン合成低下作用は, これらのラジカスカルベンジャーによっては防止されなかった。

3. ランゲルハンス島核ポリADP-リボース合成酵素阻害物質によるアロキサンおよびストレプトゾトシンのプロインスリン合成低下作用の防止

筆者らはつぎに, ランゲルハンス島細胞核のポリADP-リボース合成酵素を阻害する物質が, アロキサンあるいはストレプトゾトシンのプロインスリン合成低下作用にどのように影響するかを検討した。

図6はYamamotoら¹⁰⁾がランゲルハンス島ポリADP-リボース合成酵素阻害物質としてすでに明らかにしているニコチン酸アミドとピコリン酸アミドに加え, ベンズアミドとその誘導体, およびテオフィリン, イソブチルメチルキサンチンのランゲルハンス島ポリADP-リボース合成酵素活性におよぼす阻害効果を示す。50%阻害濃度は, ベンズアミド系が5~35 μ Mと最も低く, ニコチン酸アミド, ピコリン酸アミド, テオ

フィリン, イソブチルメチルキサンチンは 0.1mM 前後の値を示した。

これらのポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質をアロキサンあるいはストレプトゾトシンと共に培地中に加えてランゲルハンス島をインキュベートし、プロインスリン合成能を調べた結果が図 7 である。アロキサンによるプロインスリン合成低下 (対照の 32%) は、0.2, 0.5, 1mM ベンズアミドの共存により、それぞれ 48, 62, 92% に回復した (図 7, a)。ストレプトゾトシンによるプロインスリン合成低下も、ベンズアミドの濃度に依存して防止された (図 7, e)。その他のランゲルハンス島ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質もア

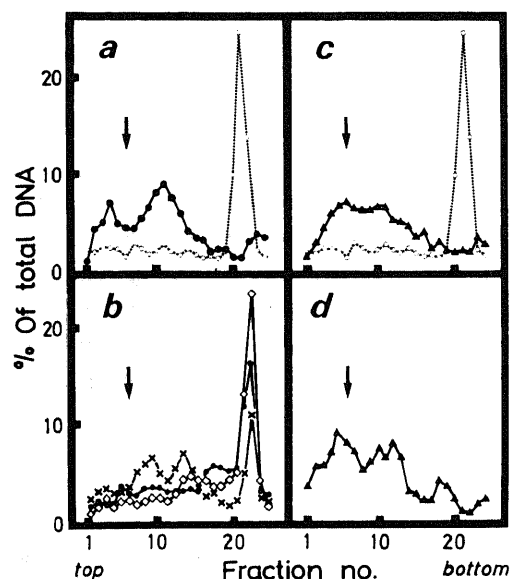


Fig 4. Effect of radical scavengers on alloxan- or streptozotocin-induced islet DNA strand breaks. DNA of islets incubated with the chemicals was analyzed by velocity sedimentation in an alkaline sucrose density gradient. Each point represents the percentage of total DNA recovered. a, DNA of islets incubated without any addition (○), with 1 mM alloxan (●); b, with 1 mM alloxan and 2×10^3 U/ml superoxide dismutase (●), with 1 mM alloxan and 100 U/ml catalase (×), with 1 mM alloxan, 2×10^3 U/ml superoxide dismutase and 100 U/ml catalase (◇); c, without any addition (○), with 3 mM streptozotocin (▲); d, with 3 mM streptozotocin and 2×10^3 U/ml superoxide dismutase (▲). Sedimentation was from left to right. Arrow indicates the position of a bacteriophage λ DNA.

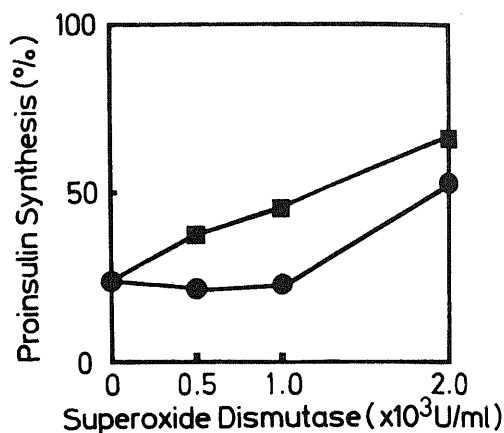


Fig 5. Effect of superoxide dismutase and catalase on alloxan-induced inhibition of proinsulin synthesis. Each point indicates the percentage of the control without alloxan (2985 cpm ^3H -proinsulin synthesized per 60 min per islet). ●; 1 mM alloxan. ■; 1 mM alloxan and 100 U/ml catalase. The concentration of superoxide dismutase added is shown on abscissa.

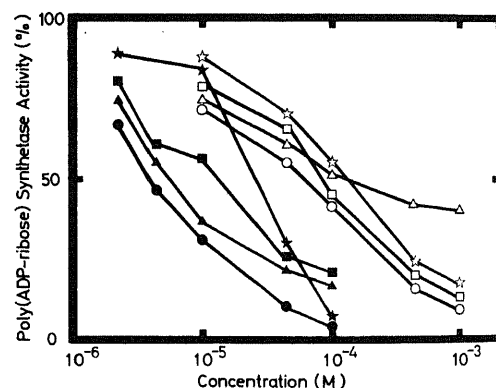


Fig 6. Inhibition of islet nuclear poly(ADP-ribose) synthetase. All activities were related to that of an equivalent quantity of islet nuclear fraction without inhibitor (57.3 pmoles poly(ADP-ribose) synthesized per 10 min per μg islet nuclear DNA; this value was approximately fivefold higher than those assayed without the addition of histone H1^(10,11)). Benzamide (●), 3-aminobenzamide (▲), 3-nitrobenzamide (■), 3-methoxybenzamide (★), theophylline (○), 3-isobutyl-1-methylxanthine (△), picolinamide (□) and nicotinamide (☆).

ロキサンとストレプトゾトシンによるプロインスリン合成低下を著しく防止した(図7, a-h)。しかも, ポリ ADP-リボース合成酵素の阻害能が強い物質ほどより低濃度で防止効果を発揮する傾向が認められた。ま

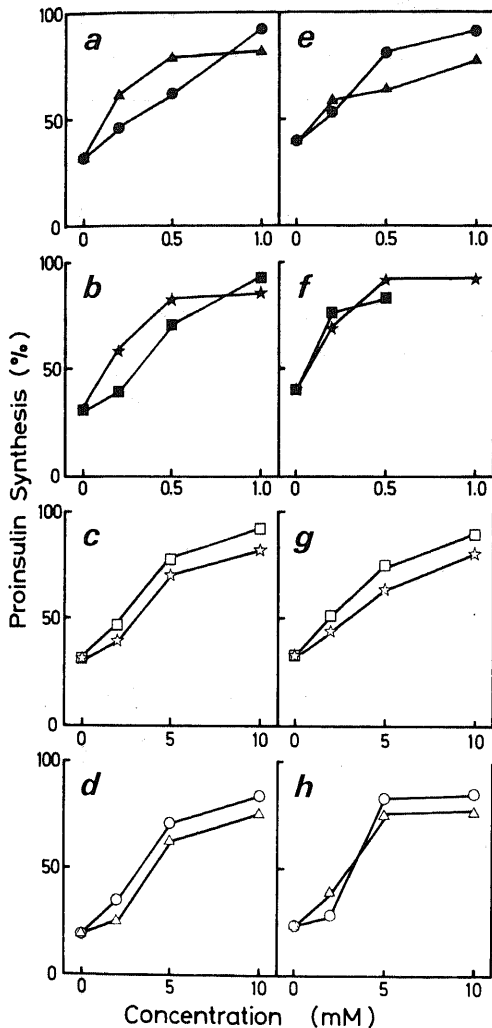


Fig 7. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors on alloxan- or streptozotocin- induced inhibition of proinsulin synthesis. Islets were incubated in the presence of 0.75 mM alloxan (a-d) or 3 mM streptozotocin (e-h) after the pretreatment with benzamide (●), 3-aminobenzamide (▲), 3-nitrobenzamide (■), 3-methoxybenzamide (★), picolinamide (□), nicotinamide (☆), theophylline (○) or 3-isobutyl-1-methylxanthine (△). Each point indicates the percentage of the control incubated without any addition.

た, 培地中のポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質の濃度を酵素活性のほぼ完全な抑制が認められた濃度(ベンズアミドで 1mM, ニコチン酸アミドで 10mM など)にまで上昇させると, アロキサンとストレプトゾトシンによるプロインスリン合成低下はほぼ完全に防止された。

4. ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質のアロキサン, ストレプトゾトシンによるランゲルハンス島 DNA 切断におよぼす影響

以上述べてきたように, ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質はアロキサン, ストレプトゾトシンによるプロインスリン合成低下を防止したが, 図 8 に示すように, アロキサン, ストレプトゾトシンによる DNA 切断に対しては全く影響を与えず, DNA は切断されたままであった。

考 察

1890 年 Mering と Minkowski²⁷⁾は膵摘出動物が糖尿病状態に陥ることを見出した。ここに糖尿病の実験科学的研究の歴史の第 1 ページがひらかれ, 1922 年には Banting と Best²⁷⁾によりインスリンが発見された。さらに 1943 年アロキサン²⁸⁾が, ついで 1963 年ストレプトゾトシン²⁹⁾が催糖尿病物質として見出され実験的糖尿病の作製に用いられるにおよんで, 夥しい量の知見が集積されるところとなった。しかし, その多くは, アロキサン糖尿病あるいはストレプトゾトシン糖尿病といったすでに発症してしまった後の糖尿病状態やそれに対する対症的治療に関するものであり, 発症機構そのものについてはなお不明のままであった。

筆者らは過去数年来, アロキサンとストレプトゾトシンの作用機構を, 分離ランゲルハンス島を用いた細胞レベルさらには分子レベルの実験により追求してきた結果, この 2 つの代表的催糖尿病物質が共に, ランゲルハンス島の DNA 鎖を切断して核ポリ ADP-リボース合成酵素を活性化することを見出し¹¹⁾, ランゲルハンス島 DNA 切断→ポリ ADP-リボース合成酵素活性化→NAD 量減少→プロインスリン合成低下, という糖尿病発症の新機序を提唱してきた^{11)~13), 25)} (図 9)。

本研究において, 筆者は, アロキサンあるいはストレプトゾトシンのラットへの *in vivo* 投与によりランゲルハンス島 DNA 鎖が切断され NAD 量が減少することを見出し, 上述の DNA 切断にはじまる一連の“Biochemical events”が *in vivo* でも実際に引き起こされることを明らかにした。一方, ランゲルハンス島に隣

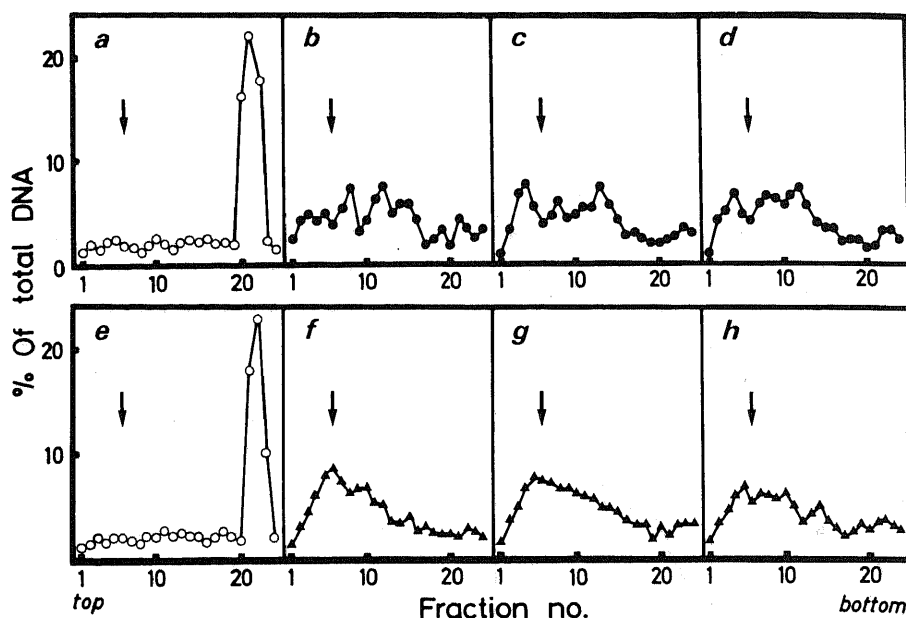


Fig 8. Sedimentation profile in an alkaline sucrose gradient of DNA of islets incubated with alloxan or streptozotocin in the presence of poly (ADP - ribose) synthetase inhibitors. Each point represents the percentage of total DNA recovered. \circ ; DNA of islets incubated without alloxan (a) or streptozotocin (e). \bullet ; Islets incubated with 1 mM alloxan (b), 1 mM alloxan and 4 mM nicotinamide (c), 1 mM alloxan and 1 mM 3 - aminobenzamide (d). \blacktriangle ; Islets incubated with 3 mM streptozotocin (f), 3 mM streptozotocin and 4 mM nicotinamide (g), 3 mM streptozotocin and 1 mM 3 - aminobenzamide (h). Sedimentation was from left to right. Arrow indicates the position of a bacteriophage λ DNA.

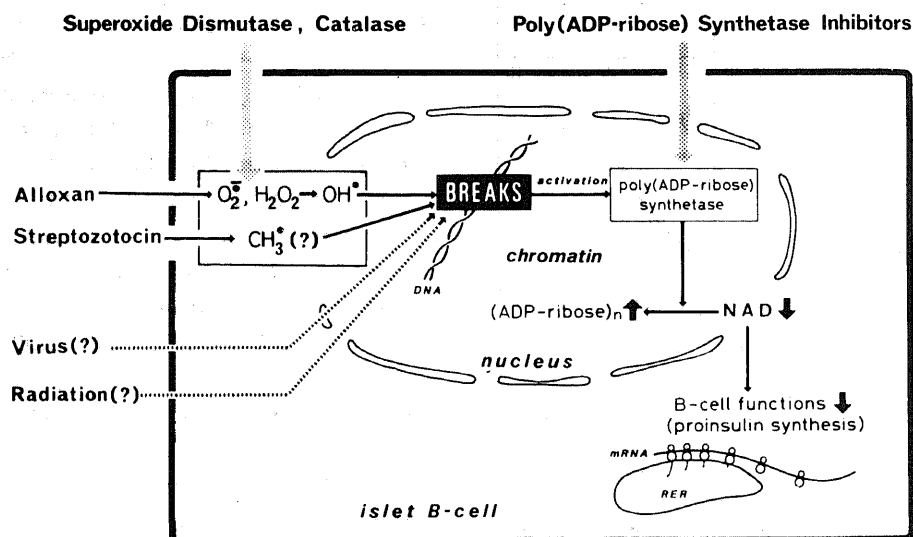


Fig 9. Proposed mechanisms of action of alloxan and streptozotocin on islet B - cells. As indicated by the shaded lines, superoxide dismutase and catalase may protect against alloxan - induced DNA strand breaks by preventing the formation of OH^\bullet , and poly(ADP - ribose) synthetase inhibitors may protect against alloxan - and streptozotocin - induced depression of proinsulin synthesis by inhibiting NAD degradation through poly(ADP - ribose). RER, rough endoplasmic reticulum.

接する組織である膵外分泌腺の DNA はアロキサン、ストレプトゾトシンの *in vivo* 投与の影響を全くうけなかった。このことは、これらの催糖尿病物質がランゲルハンス島細胞にきわめて特異的な親和性を有することを示している。ただ、ストレプトゾトシンについては、肝細胞 DNA をも切断することが認められた。この結果は、 ^{14}C でラベルしたストレプトゾトシンをマウスに投与すると肝にもかなりの取込みが認められるという Tjalve ら³⁰⁾の結果や、ラット肝 DNA がストレプトゾトシン投与により著しくメチル化されるという Bennett ら³¹⁾の実験結果と一致するものであり、ストレプトゾトシンが肝細胞にもある程度の親和性を有することを示唆している。

本研究ではまた、分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* 実験により、アロキサンの DNA 切断作用さらにはプロインスリン合成低下作用が、スーパーオキシドラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) を消去するスーパーオキシドジスムターゼと、パーオキシド (H_2O_2) を消去するカタラーゼとにより“additively”に防止されることが見出された。活性酸素のうち最も高い反応性を有するハイドロキシルラジカル ($\text{OH}\cdot$) が次式の反応により生成される³²⁾ことを考え合わせると、 $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}\cdot + \text{OH}^- + \text{O}_2$ アロキサンによる DNA 切断のメカニズムとして、図 9 に示すように、アロキサンから最終的に $\text{OH}\cdot$ が生成され、この $\text{OH}\cdot$ が DNA 鎖を切断することが考えられる。ごく最近、Brawn ら³³⁾も $\text{OH}\cdot$ がプラスミド DNA を切断する可能性を示している。

一方、ストレプトゾトシンの DNA 切断作用はラジカスカベンジャーにより防止されなかった。このことは、ストレプトゾトシンの *in vivo* での催糖尿病作用がスーパーオキシドジスムターゼの併用投与によっても影響されなかったという Gold ら³⁴⁾の報告と一致する。したがって、アロキサンの場合と異なり、ストレプトゾトシンの DNA 切断は活性酸素によるものではないと考えられる。エチルニトロソウレアについて示唆されているように³⁴⁾、ストレプトゾトシンによる DNA 鎖切断はおそらく、DNA 塩基のアルキル化に伴うものである。

本研究では、さらに、ベンズアミドなどのランゲルハンス島核ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質により、アロキサンおよびストレプトゾトシンのプロインスリン合成低下作用が防止されることが見出された。ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質は一方、アロキサン、ストレプトゾトシンの DNA 切断作用には影響を

およぼさなかった。したがって、図 9 に示すように、ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質は、ポリ ADP-リボースへの NAD 分解を阻止することによりプロインスリン合成低下を防止するものと考えられる。

本論文では、アロキサンとストレプトゾトシンのランゲルハンス島細胞への作用とその防止の機構を中心に述べてきたが、これらの結果から、アロキサン、ストレプトゾトシンといった化学物質だけでなく、ランゲルハンス島細胞に親和性のウイルスや radiation などにより、ランゲルハンス島 DNA が切断されポリ ADP-リボース合成酵素が活性化されることによって、インスリン依存性糖尿病 (I 型糖尿病) が発症するという可能性が考えられた (図 9)。

結 論

筆者らは先に、分離ランゲルハンス島を用いた *in vitro* 実験により、代表的催糖尿病物質であるアロキサンとストレプトゾトシンが、ランゲルハンス島 DNA 鎖を切断することにより核ポリ ADP-リボース合成酵素を活性化し、その結果 NAD 量の減少とプロインスリン合成の低下とを来たすことを明らかにしている (Yamamoto *et al.* Nature 294, 284-286 (1981))。

今回の研究により筆者は、ラジカスカベンジャーであるスーパーオキシドジスムターゼとカタラーゼがアロキサンによるランゲルハンス島 DNA 切断さらにはプロインスリン合成低下を防止することを見出し、また、ランゲルハンス島ポリ ADP-リボース合成酵素阻害物質がアロキサンおよびストレプトゾトシンのプロインスリン合成低下作用を防止することを明らかにした。これらの結果は、アロキサンが活性酸素の生成を介してランゲルハンス島 DNA を切断することを示すとともに、アロキサンとストレプトゾトシンが、DNA 鎖を切断しポリ ADP-リボース合成酵素を活性化する結果、ランゲルハンス島でのプロインスリン合成を低下させることをさらに強く支持している。

本研究では、アロキサン、ストレプトゾトシンのラットへの *in vivo* 投与によってもランゲルハンス島の DNA 切断と NAD 量減少が見出された。したがって、これらの催糖尿病物質は、*in vivo* でも、DNA 切断 \rightarrow ポリ ADP-リボース合成酵素活性化 \rightarrow NAD 量減少 \rightarrow プロインスリン合成低下という一連の“Biochemical events”をランゲルハンス島細胞内でひき起こすことにより糖尿病を発症させるものと考えられた。

本研究により、インスリン依存性糖尿病 (I 型糖尿

病)の成因さらには予防を解明するための重要な手がかりが得られたものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました米山良昌教授ならびに岡本宏教授に心から感謝いたします。また、本研究遂行に際し御協力、御助言いただきました金沢大学医学部第一生化学・松川茂助手、ならびに富山医科薬科大学医学部第一生化学・野瀬清助教授、伊藤信行助手、内潟安子博士、恒田則子技官に厚く御礼申し上げます。

本研究は、文部省科学研究費・がん特別研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) Yamamoto, H., Nose, K., Itoh, N. & Okamoto, H.: Quantitation of proinsulin mRNA sequences in hamster insulinoma cells in culture by molecular hybridization. *Experientia*, 36, 187 - 188 (1980).
- 2) 山本博・岡本宏: 細胞系を用いるホルモンの生合成, 内分泌実験講座(鎮目和夫・井村裕夫・矢内原界編), 第3巻, 88 - 107 頁, 東京, 講談社サイエンティフィク, 1981.
- 3) 山本博・伊藤信行・成照信・野瀬清・岡本宏: "Translational level"での proinsulin 生合成調節の可能性について. *生化学*, 50, 857 (1978).
- 4) 山本博・伊藤信行・岡本宏・柿崎正栄・後藤由夫: 自然発症糖尿病ラット膵ランゲルハンス島のプロインスリン合成能について. *生化学*, 51, 867 (1979).
- 5) 山本博・武田裕輔・伊藤信行・野瀬清・岡本宏: Nicotinamide の proinsulin 合成促進作用について. *糖尿病*, 22, 317 (1979).
- 6) Okamoto, H., Nose, K., Itoh, N., Sei, T. & Yamamoto, H.: The translational control of proinsulin synthesis in pancreatic islets, p27 - 35. In S. Baba, T. Kaneko & N. Yanaihara (ed.), *Proinsulin, insulin, C-peptide*, Excerpta Medica, Amsterdam, 1979.
- 7) 山本博・河村明典・伊藤信行・岡本宏・柿崎正栄・後藤由夫: 自然発症糖尿病ラット及び飢餓ラット膵ランゲルハンス島のインスリン合成能の亢進について. *糖尿病*, 23, 417 (1980).
- 8) 河村明典・山本博・伊藤信行・岡本宏: 飢餓ラットから分離したランゲルハンス島のインスリン合成能の亢進とその機構. *生化学*, 52, 736 (1980).
- 9) 岡本宏・伊藤信行・野瀬清・山本博: インスリン生合成の新しい調節機構(translational control)とその意義. *生化学*, 52, 530 (1980).
- 10) Yamamoto, H. & Okamoto, H.: Protection by picolinamide, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase, against both streptozotocin-induced depression of proinsulin synthesis and reduction of NAD content in pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 474 - 481 (1980).
- 11) Yamamoto, H., Uchigata, Y. & Okamoto, H.: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature (London)*, 294, 284 - 286 (1981).
- 12) Yamamoto, H., Uchigata, Y. & Okamoto, H.: DNA strand breaks in pancreatic islets by *in vivo* administration of diabetogenic doses of alloxan or streptozotocin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 103, 1014 - 1020 (1981).
- 13) Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A. & Okamoto, H.: Protection by radical scavengers and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J. Biol. Chem.* (1981), in press.
- 14) 山本博・岡本宏: Streptozotocin 糖尿病発症機構についての新しい考え方. *糖尿病*, 23, 392 (1980).
- 15) 山本博・河村明典・谷村正人・岡本宏: Poly ADPR 合成酵素阻害物質による proinsulin 合成低下の防止. *生化学*, 52, 764 (1980).
- 16) 山本博・池本雅仁・大石園・栗原照昌・岡本宏: Alloxan と streptozotocin は共にラ島ポリ ADP-リボース合成酵素の活性化を介してプロインスリン合成を阻害する. *糖尿病*, 24, 166 (1981).
- 17) 山本博・内潟安子・岡本宏: Alloxan および streptozotocin によるランゲルハンス島 DNA 鎖の切断とポリ ADPR 合成酵素の活性化. *生化学*, 53, 991 (1981).
- 18) 山本博・岡本宏: ストレプトゾトシン・ニコチン酸アミド併用投与によるインスリンノーマ細胞の増殖抑制とその機構. *日本癌学会総会記事*, 40, 273 (1981).

- 19) Rerup, C. C.: Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 22, 485 - 518 (1970).
- 20) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R.: Inhibition by somatostatin of insulin release from isolated pancreatic islets. *FEBS Lett.*, 54, 103 - 105 (1975).
- 21) Cox, R., Damjanov, I., Abanobi, S. E. & Sarma, D. S. R.: A method for measuring DNA damage and repair in the liver. *Cancer Res.*, 33, 2114 - 2121 (1973).
- 22) Kissane, J. M. & Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 233, 184 - 188 (1958).
- 23) Noto, Y. & Okamoto, H.: Inhibition by kynurenine metabolites of proinsulin synthesis in isolated pancreatic islets. *Acta Diabetol. Lat.*, 15, 273 - 282 (1978).
- 24) Itoh, N. & Okamoto, H.: Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature (London)*, 283, 100 - 102 (1980).
- 25) Okamoto, H.: Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin - dependent diabetes (review). *Mol. Cell. Biochem.*, 37, 43 - 61 (1981).
- 26) Mering, J. von & Minkowski, O.: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Arch. Exper. Pharmacol.*, 26, 371 - 387 (1890).
- 27) Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R. & Fletcher, A. A.: Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. *Can. Med. Ass. J.*, 12, 141 - 146 (1922).
- 28) Dunn, J. S., Sheehan, H. L. & McLetchie, N. G. B.: Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet*, 1, 484 - 487 (1943).
- 29) Rakieten, N., Rakieten, M. L. & Nadkarni, M. V.: Studies on the diabetogenic actions of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.*, 29, 91 - 98 (1963).
- 30) Tjälve, H., Wilander, E. & Johansson, E. B.: Distribution of labelled streptozotocin in mice: uptake and retention in pancreatic islets. *J. Endocrinol.*, 69, 455 - 456 (1976).
- 31) Bennett, R. A. & Pegg, A. E.: Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.*, 41, 2786 - 2790 (1981).
- 32) McCord, J. M. & Day, E. D. Jr.: Superoxide - dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron - EDTA complex. *FEBS Lett.*, 86, 139 - 142 (1978).
- 33) Brawn, K. & Fridovich, I.: DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206, 414 - 419 (1981).
- 34) Gold, G., Manning, M., Heldo, A., Nowlain, R., Pettit, J. R. & Grodsky, G. M.: Diabetes induced with multiple subdiabetogenic doses of streptozotocin: lack of protection by exogenous superoxide dismutase. *Diabetes*, 30, 634 - 638 (1981).
- 35) Erickson, L. C., Bradley, M. D. & Kohn, K. W.: Strand breaks in DNA from normal and transformed human cells treated with 1, 3 - bis (2 - chloroethyl) - 1 - nitrosourea. *Cancer Res.*, 37, 3744 - 3750 (1977).

DNA Strand Breaks by Alloxan and Streptozotocin in Pancreatic Islets of Langerhans and Protecting Mechanisms against Experimental Diabetes Hiroshi Yamamoto, Department of Biochemistry (Director: Prof. Y. Yoneyama), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Department of Biochemistry (Director: Prof. H. Okamoto), School of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama, 930-01 — J. Jusen Med. Soc., 90, 809–820 (1981)

Key words: Alloxan, Streptozotocin; Pancreatic islets of *Langerhans*, DNA strand breaks, Proinsulin synthesis.

Abstract

A previous *in vitro* study with isolated rat pancreatic islets has shown that alloxan and streptozotocin, typical diabetogenic agents, cause DNA strand breaks to stimulate nuclear poly (ADP-ribose) synthetase, thereby depleting intracellular NAD level and inhibiting proinsulin synthesis. In the present study, experiments were designed to examine whether or not the biochemical events initiated by islet DNA breaks were induced *in vivo* by alloxan- or streptozotocin-administration. Diabetogenic doses of alloxan or streptozotocin were injected intravenously to Wistar rats, and velocity sedimentation of DNA from islet or non-islet cells was carried out in an alkaline sucrose density gradient. Islet DNA was found to actually be fragmented *in vivo* by alloxan or streptozotocin treatment. However, DNA of pancreatic exocrine cells was not affected by either alloxan- or streptozotocin-administration. Hepatocyte DNA was fragmented by streptozotocin administration but not by alloxan. Intracellular NAD level was decreased in the tissues whose DNA was fragmented. The results might raise a novel aspect concerning the organotropisms of the diabetogenic agents as well as concerning the mechanisms of the action of the agents. Moreover, the *in vitro* study with isolated islets of rats revealed that superoxide dismutase and catalase, scavengers of radical oxygens, protected against islet DNA strand breaks and inhibition of proinsulin synthesis induced by alloxan. This indicates that alloxan broke islet DNA strands through the formation of radical oxygens. The radical scavengers did not affect islet DNA strand breaks or inhibition of proinsulin synthesis induced by streptozotocin. On the other hand, compounds that inhibited islet nuclear poly (ADP-ribose) synthetase were found to protect against alloxan- as well as streptozotocin-induced inhibition of proinsulin synthesis. The poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors were ineffective in protection against DNA strand breaks induced by alloxan or streptozotocin. These results also support the proposal that alloxan and streptozotocin induce diabetes through the following biochemical events; islet DNA strand breaks \Rightarrow stimulation of nuclear poly (ADP-ribose) synthetase \Rightarrow depletion of intracellular NAD \Rightarrow inhibition of proinsulin synthesis. The evidence presented here may provide clues for elucidating the prevention of insulin-dependent diabetes as well as for understanding its etiology.